

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/74337 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 9/50**

(74) Anwalt: **CHRISTOPHERSEN, Ruth**; Kapellstrasse 12,  
40479 Düsseldorf (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03318

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, CZ, HU, ID, IL, JP,  
MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, UA, US, ZA.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. März 2001 (23.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): eurasisches Patent (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 16 559.1 3. April 2000 (03.04.2000) DE

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**  
— *erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US*): **EUCRO EUROPEAN CONTRACT RESEARCH  
GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Stresemannallee 6, 41460  
Neuss (DE).

**Veröffentlicht:**  
— *mit internationalem Recherchenbericht*  
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen*

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **BLUM, Helmut**  
[DE/DE]; Bertha-von-Suttner-Strasse 30, 40595 Düssel-  
dorf (DE). **ROTH, Marcel** [DE/DE]; Am Nettesfeld 21,  
40589 Düsseldorf (DE). **GREB, Wolfgang** [DE/DE]; Am  
Fronberg 11, 40489 Düsseldorf (DE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: SYSTEM FOR TRANSPORTING ACTIVE SUBSTANCES IN A BIOLOGICAL SYSTEM

(54) Bezeichnung: SYSTEM FÜR DEN TRANSPORT VON AKTIVSTOFFEN IN EINEM BIOLOGISCHEN SYSTEM

(57) Abstract: The invention relates to a stabilizer-free system for transporting active substances in a biological system, consisting of one or more active substances and magnetic particles. The inventive system is characterized in that the particles are provided with active substances on at least part of their surface. The magnetic particles do not necessarily have to be modified in this system. The system can be incorporated into aqueous and oily suspensions, as well as in microemulsions, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions and water-in-oil-in-water emulsions.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein stabilisator-freies System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System aus einem oder mehreren Aktivstoff(en) sowie magnetischen Partikeln, beansprucht, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Partikel auf zumindest einem Teil ihrer Oberfläche mit Aktivstoff(en) versehen sind. In diesem System ist eine Modifizierung der magnetischen Partikel nicht unabdingbar erforderlich. Es kann sowohl in wässrige und ölige Suspensionen als auch in Mikroemulsionen, Öl-in-Wasser-Emulsionen, Wasser-in-Öl-Emulsionen und auch Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen eingearbeitet werden.



WO 01/74337 A1

**System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System, bestehend aus Aktivstoff sowie magnetische(n) Partikel(n), ein Verfahren zur Herstellung dieses Systems sowie die Verwendung des Systems zum Transport für pharmazeutische Wirk- und Aktivstoffe.

0

Unter Ferrofluiden versteht man magnetische Flüssigkeiten, in denen eine ferri- oder ferromagnetische Substanz, in der Regel Magnetit, als eine kolloidal dispergierte Phase in einem flüssigen Dispersionsmedium, wie Wasser, Paraffin, Toluol oder einer beliebigen anderen Flüssigkeit bis hin zu Quecksilber, dispergiert ist. Häufig wird ein Tensid oder Benetzungsmittel, wie Oleinsäure, einem solchen Gemisch zugefügt, um die Agglomeration und somit die Bildung größerer Aggregate zu vermeiden. Aufgrund der geringen Größe der Kristallite verhalten sich die Teilchen superparamagnetisch, d.h. es ist keine Permanentmagnetisierung möglich.

5

Die Ferrofluide und auch andere metallische Kolloide sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung, da sie dazu in der Lage sind, Makromoleküle, insbesondere Proteine, zu binden.

10

Ein weiteres Einsatzgebiet der Ferrofluide ist, unerwünschte Zellen, insbesondere Krebszellen, aus Zellsuspensionen, zu entfernen. Beispielsweise bei der Behandlung von Krebs kann durch die Entfernung von Zellen eine Vielzahl von Problemen umgangen werden, wie der Einsatz von Toxinen, chemotherapeutischen Mitteln usw., wobei derartige Verfahren auf die physikalische Behandlung beschränkt sind. Die Dichte-Gradienten-Separation wurde zur Entfernung von Lymphocyten aus Knochenmarkzellen verwendet, jedoch ohne große Effizienz.

15

20

Eingesetzt werden unterschiedliche Arten von magnetischen Teilchen auch in Immunoassays, im Drug-Targeting und für Zellabtrennungen. Das am häufigsten verwendete magnetische Material ist Magnetit, das in eine Vielzahl von Trägersystemen oder Mikrosphären eingearbeitet wird oder direkt an Antikörper gebunden wird. Üblicherweise sind die magnetischen Partikel in entsprechende Hüllsubstanzen eingebettet, wie Polymere oder Kieselgele.

25

Aus der europäischen Patentanmeldung EP 0 156 537 sind magnetische kolloidale Flüssigkeiten bekannt, worin die magnetische Phase kolloidal in einem flüssigen Dispersionsmedium dispergiert ist. Die magnetische Phase umfasst feine magnetische Teilchen, die mit einem vernetzten, biologisch kompatiblen Polymer beschichtet sind.

5

In der deutschen Patentanmeldung DE 43 07 262 wird ein Verfahren zur Herstellung von magnetischem polymeren Siliciumdioxid beschrieben, worin magnetische Materialien, insbesondere Fe,  $\beta$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, in Alkalisilikatlösungen dispergiert oder als kolloidale Lösung zugegeben und mit Mineralsäuren oder Kohlendioxid gefällt und kondensiert werden. Auf die Oberfläche der erhaltenen Teilchen können Röntgenkontrastmittel aufgebracht werden. Sie werden bei bildgebenden Ultraschall- und NMR-Diagnostikverfahren eingesetzt sowie auch zur Anreicherung von radioaktiven Isotopen. Ein weiteres Einsatzgebiet ist der extra- oder intrakorporale Austrag oder die Bindung von biologischen Inhaltsstoffen, toxischen Substanzen, Bakterien oder Viren aus dem Organismus mit Hilfe von Magnetfeldern.

10

15

In der deutschen Patentanmeldung DE 43 25 386 wird eine magnetische Flüssigkeit (Ferrofluid) auf der Basis einer wässrigen Trägerflüssigkeit offenbart, worin magnetische Eisenoxidteilchen, die zum größten Teil aus Magnetit bestehen, durch eine erste monomolekulare Adsorptionsschicht aus gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren und eine zweite Adsorptionsschicht aus oberflächenaktiven Substanzen stabilisiert sind. Sowohl die erste als auch die zweite Adsorptionsschicht bestehen aus Tensiden, die vollständig aus natürlich nachwachsenden Rohstoffen hergestellt sind. Die beschriebene wässrige magnetische Flüssigkeit kann in der Medizin als Markierungsstoff und/oder zum Transport von Wirkstoffen eingesetzt werden.

20

25

Eine Aufgabe der im Stand der Technik beschriebenen Partikel ist der zielgerichtete Transport von Stoffen, wie pharmazeutischen Wirkstoffen, im Körper und deren Anreicherung an gewünschten Stellen. Dieser Transport kann im wesentlichen mittels zweier Methoden erreicht werden, nämlich zum einen über die Anreicherung mittels an der Partikeloberfläche immobilisierter Antikörper oder mittels Permanentmagnetfeld.

30

Die bekannten eingesetzten magnetischen Partikel sind in der Regel Polymerpartikel mit Größen oberhalb 500 nm, die aus anorganischem oder organischem Polymer und eingelagerten magnetischen Teilchen bestehen. Kleinere Partikel werden üblicherweise nicht eingesetzt, da sich Partikel mit einer Teilchengröße unter 100 nm, sofern stabilisiert, kaum mittels eines Magnetfelds aufkonzentrieren lassen.

35

Ein wichtiges Einsatzgebiet der magnetischen bzw. superparamagnetischen Partikel im medizinischen Bereich ist die Chemotherapie zur Krebsbehandlung oder der Schutz von Implantaten mittels Antibiotika. Die Anbindung der Wirkstoffe erfolgt durch Quellung der Polymerpartikel oder durch Adsorption an die polymeren Oberflächen. Die magnetischen Teilchen können auch in wässrigem Medium suspendiert eingesetzt werden, wobei an deren Oberfläche üblicherweise oberflächenaktive Substanzen angelagert sind, welche die magnetischen Teilchen sowie gegebenenfalls daran adsorbierte Wirkstoffe in Suspension halten.

Wie bereits beschrieben, weisen die aus dem Stand der Technik bekannten magnetischen Partikel, die zur Anreicherung oder zum zielgerichteten Transport von Stoffen in biologischen Systemen eingesetzt werden, eine modifizierte Oberfläche auf. Die Modifikation der Oberfläche dient dazu, diese Stoffe in Suspension zu halten und die Aktivstoffe zu binden. Die Modifizierung der Oberflächen hat den Nachteil, dass diese Modifizierung ein zusätzlicher Arbeitsschritt bei der Herstellung darstellt. Ferner besteht die Gefahr, dass die zur Modifikation der Oberflächen eingesetzten Polymere mit den Aktivstoffen und gegebenenfalls auch mit im biologischen System, d.h. im Körper, befindlichen Proteinen etc. Wechselwirkungen eingehen können, die die Wirksamkeit der Aktivstoffe beeinträchtigt und in manchen Fällen sogar zu unerwünschten, ggf. toxischen Nebenreaktionen und Wirkungen dieser Mittel führen kann.

Ein weiterer Nachteil ist, dass das nachträgliche Aufbringen einer Beschichtung auf bereits oberflächenmodifizierte Partikel aufwendig und daher zeitintensiv ist. Schließlich weisen die beschichteten Partikel eine relativ geringe Adsorptionskapazität für pharmazeutische Wirkstoffe auf.

In der EP 0 275 285 B1 wird ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen superparamagnetischen Fluids beschrieben, in dem das Dispergieren und Stabilisieren durch Einsatz von Ultraschall erfolgt. Die Ultraschallbehandlung hat den Nachteil, dass durch diesen Energieeintrag ggf. auf den Partikeln aufgebrauchte, thermisch oder mechanisch instabile Substanzen zerstört werden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System zur Verfügung zu stellen, worin eine Modifizierung der magnetischen Partikel nicht unabdingbar erforderlich ist und das eine Einarbeitung dieser Partikel sowohl in wässrige und ölige Suspensionen als auch in Mikroemulsionen, Öl-in-

Wasser-Emulsionen, Wasser-in-Öl-Emulsionen und auch Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen ermöglicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demgemäß ein Stabilisator-freies System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System aus einem oder mehreren Aktivstoff(en) sowie magnetischen Partikeln, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Partikel auf zumindest einem Teil ihrer Oberfläche mit Aktivstoff(en) versehen sind.

Stabilisator-frei bedeutet in der vorliegenden Erfindung, dass die magnetischen Partikel ohne Zusatz von Hilfsmitteln, wie Emulgatoren oder Oberflächenbeschichtungen, wie sie im Stand der Technik beschrieben werden, mit Aktivstoffen beaufschlagt sind bzw. von diesen umhüllt sind. Auch ist eine Behandlung von mit Aktivstoffen beladenen Partikeln nicht erforderlich und vorzugsweise ausgeschlossen. In der einfachsten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung besteht das erfindungsgemäße System aus magnetischem Partikel und Aktivstoff.

Erfindungsgemäß ist zumindest ein Teil der Oberfläche der magnetischen Partikel mit Aktivstoff(en) versehen. Das bedeutet, dass die Aktivstoffmoleküle unmittelbar auf der Oberfläche der Partikel aufgebracht sind. Die Partikel können auch vom Aktivstoff umhüllt sein, was zum Beispiel dann der Fall ist, wenn die Aktivstoffe aufgrund ihrer Struktur, Form oder Größe die magnetischen Partikel umgeben aber nicht auf der Oberfläche direkt aufgebracht sind. Eine Umhüllung liegt beispielsweise dann vor, wenn als Aktivstoffe Zellen, Zellkulturen bzw. Zellbestandteile verwendet werden und die magnetische Partikel im inneren der Zellen, Zellkulturen bzw. Zellbestandteile vorliegen, oder wenn die Aktivstoffe aufgrund ihrer Molekülgröße die Struktur eines Knäuels aufweisen, in dessen Inneren sich die magnetischen Partikel befinden.

Das erfindungsgemäße System kann zum zielgerichteten Transport von Aktivstoffen an einen speziellen Wirkort im Körper bzw. biologischen System als auch zum „Abtransport“, von unerwünschten Komponenten im/am Körper oder aus dem Körper eingesetzt werden. Es hat den Vorteil, dass die Aktivstoffe unmittelbar auf den Partikeln aufgebracht sind, das erfindungsgemäße System im einfachsten Fall also aus Aktivstoff(en) und magnetischen Partikeln besteht.

Es wurde festgestellt, dass durch die gezielte Beladung mit Aktivstoff zum einen eine Art Carrierfunktion der Partikel im umgebenden Medium erzielt wird und zum anderen kann durch Anlegen eines Magnetfelds eine selektive Anreicherung der beladenen Partikel (Sedimentation) und Anreicherung der Partikel erreicht werden. Eine im Vergleich zu

größeren Partikeln relativ große Partikeloberfläche ermöglicht eine höhere Beladung der Oberfläche mit Aktivstoffen, d.h. das erfindungsgemäße System kann im Vergleich zum Stand der Technik eine deutlich höhere Konzentration an Aktivstoffen aufnehmen. Insgesamt können mit weniger magnetischem Material gleiche Aktivstoffgehalte in das biologische System eingebracht werden.

Biologisches System in Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet sowohl der menschliche oder tierische Körper selbst aber auch ein extrakorporales System, wie z.B. aus dem Körper eluierte Zellen/Zellkulturen und/oder außerhalb des Körpers befindliche Geräte, in denen Körperflüssigkeiten gereinigt, werden. Die erfindungsgemäßen Partikel werden üblicherweise von den Organen, Geweben und Zellen sowie Implantaten aufgenommen.

Als magnetische Partikel werden insbesondere superparamagnetische Partikel eingesetzt, insbesondere Metalloxide oder Metalle. Superparamagnetische Teilchen besitzen keine Remanenz, d.h. sie lassen sich in einem magnetischen Gradientenfeld reversibel bewegen und konzentrieren.

Der Vorteil der eingesetzten magnetischen Partikel besteht insbesondere darin, dass sie vollständig aus anorganischem Material aufgebaut sind und sich gut im Magnetfeld sedimentieren lassen. Für den Einsatz der Partikel zum Transport von Aktivstoffen im biologischen System sind keine weiteren Komponenten für die Modifikation der Partikel selbst erforderlich, wie Beschichtung mit Polymeren etc. Das System kann für den jeweiligen Anwendungszweck beliebig konfektioniert bzw. eingestellt werden.

Beispiele für geeignete magnetische Partikel sind  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  und deren beliebigen Gemische, wobei  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Magnetit) besonders bevorzugt eingesetzt wird. Als mögliche Metalle sind Fe, Co, Ni sowie deren Legierung ggf. auch mit anderen Metallen zu nennen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten magnetischen Partikel weisen vorzugsweise eine Teilchengröße von 1 bis 300 nm, vorzugsweise bis 100 nm auf, wobei hier die einzelnen diskreten Kristallite gemeint sind. Es können auch Agglomerate vorliegen, deren Gesamtteilchengröße oberhalb von 100 nm, insbesondere oberhalb von 300 nm liegt.

Die volumengewichtete mittlere Kristallitgröße ist mit Röntgenbeugungsverfahren, insbesondere über eine Scherrer-Analyse, bestimmbar. Das Verfahren ist beispielsweise beschrieben in: C. E. Krill, R. Birringer: „Measuring average grain sizes in nanocrystalline

materials,, Phil. Mag. A 77, S. 621. (1998). Demnach kann die volumengewichtete mittlere Kristallitgröße D bestimmt werden durch den Zusammenhang

$$D = K\lambda/\beta\cos\theta.$$

5

Dabei ist  $\lambda$  die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung,  $\beta$  ist die volle Breite auf halber Höhe des Reflexes an der Beugungsposition  $2\theta$ . K ist eine Konstante der Größenordnung 1, deren genauer Wert von der Kristallform abhängt. Man kann diese Unbestimmtheit von K vermeiden, indem man die Linienverbreiterung als integrale Weite  $\beta_i$  bestimmt, wobei  $\beta_i$  definiert ist als die Fläche unter dem Röntgenbeugungsreflex geteilt durch dessen maximaler Intensität  $I_0$ :

0

5

$$\beta_i = 1/I_0 \int_{2\theta_1}^{2\theta_2} I(2\theta)d(2\theta)$$

10

Dabei sind die Größen  $2\theta_1$  und  $2\theta_2$  die minimale und maximale Winkelposition des Bragg-Reflexes auf der  $2\theta$ -Achse.  $I(2\theta)$  ist die gemessene Intensität des Reflexes als Funktion von  $2\theta$ . Unter Verwendung von diesem Zusammenhang ergibt sich als Gleichung zur Bestimmung der volumengewichteten mittleren Kristallitgröße D:  $D = \lambda/\beta_i\cos\theta$ .

15

In einer möglichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die magnetischen Partikel als Nanopartikel mit einer Teilchengröße von vorzugsweise unter 100 nm eingesetzt. Auf diese Teilchen kann der eingesetzte Aktivstoff adsorbiert werden, wobei es sich als besonders vorteilhaft erwiesen hat, wenn der Aktivstoff bereits bei der Bildung der magnetischen Partikel, z.B. durch größenkontrollierte Fällung im wässrigen Medium mittels alkalischer Substanzen oder durch Reduktion von Metallkationen vorliegt. Durch die in situ erzeugte große Partikeloberfläche kann eine optimale Adsorption des Aktivstoffes an die Oberfläche mittels funktioneller, vorzugsweise ionischer oder polarer Gruppen im Aktivstoffmolekül, wie OH-, SH-, Hydroxid-, Amino-, Carboxyl-, Ether-, Sulfo-, Phosphonsäuregruppen usw., erfolgen. Es ist auch möglich, den Aktivstoff nachträglich auf die gefällten Partikel aufzubringen, z.B. durch Suspension der ungecoateten (nicht modifizierten) magnetischen Partikel in einer den Aktivstoff beziehungsweise das Aktivstoffgemisch enthaltenden flüssigen Phase, vorzugsweise Wasser.

15

In einer weiteren möglich Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die Aktivstoffe auch über sog. Spacer-Gruppen an die magnetischen Partikel gebunden werden. Spacer sind kurze organische Molekül-Ketten, die bei der Immobilisierung von Molekülen auf Trägern genutzt werden, wobei die Spacer-Moleküle keine Beschichtung darstellen. Spacer können beispielsweise eingesetzt werden, wenn die Aktivstoffe keine polaren Gruppen oder ionischen Gruppen aufweisen. Die Spacer-Moleküle können die Bindung zwischen magnetischen Partikeln und den Aktivstoffen verbessern. Sie weisen vorzugsweise eine oder mehrere polare Gruppe(n) auf. Als Beispiele kann auf die bereits genannten Gruppen verwiesen werden. Insbesondere wenn kationische Aktivstoffe verwendet werden, haben sich Spacer mit zwei polaren Gruppen, wie Aminocarbonsäuren, Diamine, Betaine, Dicarbonsäuren, Aminophosphonate, etc. als geeignet erwiesen.

In einer weiteren Ausführungsform werden sogenannte Agglomerate von magnetischen Partikeln eingesetzt, die aus Agglomeraten von Nanopartikeln, d.h. von Kristalliten mit einer Teilchengröße unter 100 nm, bestehen. Diese Agglomerate können aus einzelnen Kristalliten bestehen, welche an ihrer Kontaktfläche entweder reversibel agglomeriert oder irreversibel durch Koaleszens, d.h. durch Zusammenwachsen über die Korngrenzen hinweg, agglomeriert sind. Ein Vorteil von Agglomeraten besteht darin, dass sie sowohl eine äußere als auch eine innere Oberfläche, d.h. Hohlräume aufweisen, so dass die Aktivstoffe innen und außen gebunden werden können. Agglomerate können beispielsweise erhalten werden, indem die magnetischen Partikel in Abwesenheit eines Wirkstoffs gefällt werden, durch Trocknung oder Gefriertrocknung wirkstofffreier oder mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel mit anschließender Redispergierung, Agglomeratbildung, welche durch die Synthesebedingungen gesteuert werden kann, wie Temperaturerhöhung, Einstellung des pH-Wertes, hoher Elektrolytgehalt oder durch eine geeignete Nachbehandlung der gefällten Partikel bei Temperaturen von über 100°C.

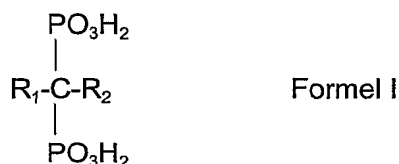
Aktivstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung sind sowohl Stoffe, die in den Körper eingebracht werden, als auch Stoffe, die aus ihm entfernt werden sollen, z.B. synthetische pharmazeutische Wirkstoffe, natürliche pharmazeutische Wirkstoffe und Extrakte, natürliche und rekombinante Peptide, Proteine, Enzyme, Antikörper und Antikörperfragmente, endogene biologische Einheiten wie lebende und abgestorbene Zellen, Zellbestandteile und Organellen, synthetische und natürliche DNA, Gene, Chromosomen, gentechnisch veränderte autologe oder heterologe Zellen, und xenobiotische Einheiten wie Bakterien, Viren, Mycoplasma, Pilze, und Sporen, wärmeleitfähige Substanzen, wie Metalle, radiologisch wirksame Stoffe, wie  $\gamma$ -Strahler, Aktivstoffe enthaltende partikuläre exogene



Einheiten wie Liposomen, Mikrokapselfn und Nanopartikel, sowie beliebige Gemische der voranstehenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Ausgestaltung sind die Aktivstoffe ausgewählt aus wasserlöslichen und/oder lipidlöslichen pharmazeutischen Wirkstoffen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als Aktivstoffe geminale Bisphosphonsäuren und/oder deren physiologisch verträglichen Salze, vorzugsweise solche mit der allgemeinen Formel I eingesetzt:



in der ist

$\text{R}_1$  ein linearer oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, der gegebenenfalls substituiert sein kann durch Substituenten wie Aminogruppen, N-Mono- bzw. N-Dialkylaminogruppen, wobei die Alkylgruppen 1 bis 5 C-Atome und/oder SH-Gruppen enthalten können, oder ein substituiertes oder unsubstituiertes carbo- oder heterocyclisches Arylrest, der ggf. ein oder mehrere Heteroatome und als Substituenten verzweigte und unverzweigte Alkylreste mit 1 bis 6 C-Atomen, freie oder mono- resp. dialkylierte Aminogruppen mit 1 bis 6 C-Atomen oder Halogenatome aufweisen kann, und  $\text{R}_2$  gleich OH, ein Halogenatom, vorzugsweise Cl, H oder  $\text{NH}_2$ .

Als Beispiele für geeignete Salze der Verbindungen mit der Formel I können Alkalimetallsalze, Ammoniumsalze und Ethanolaminsalze genannt werden.

Derartige Verbindungen eignen sich insbesondere für die Behandlung von osteoporotischen Erkrankungen, wobei folgende Verbindungen besonders bevorzugt sind:

3-(Methyl-pentylamino)-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Ibandronsäure),

1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Etidronsäure),

Dichlormethandiphosphonsäure (Clodronsäure),

3-Amino-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Pamidronsäure),

4-Amino-1-hydroxybutan-1,1-diphosphonsäure (Alendronsäure),

2-(3-Pyridin)-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Risedronsäure),

4-Chlorphenylthiomethan-1,1-di-phosphonsäure (Tiludronsäure),

Pyrimidinyl-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Zoledronsäure),  
Cycloheptylaminomethan-1,1-diphosphonsäure (Cimadronsäure),  
6-Amino-1-hydroxyhexan-1,1-diphosphonsäure (Neridronsäure),  
3-(N,N-Dimethylamino)-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Olpadronsäure),  
5 3-Pyrrol-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure und/oder  
2-Pyrimidazol-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Minodronsäure)  
sowie deren physiologisch verträglichen Salzen.

Wie bereits voranstehend ausgeführt besteht das erfindungsgemäße System in seiner  
10 einfachsten Form aus magnetischem Partikel(n) und einem oder mehreren Aktivstoff(en).  
Dieses System kann in an sich bekannter Weise in eine pharmazeutische Zubereitung für die  
orale, parenterale, intravenöse, inhalative und/oder topische Applikation überführt werden  
und dem biologischen System zugeführt werden. Als geeignete Formen der pharmazeutischen  
Zubereitung sind Suspensionen, Emulsionen und liposomale Systeme zu nennen.

15 In einer möglichen Ausführungsform liegt das erfindungsgemäße System in Form einer  
Suspension vor. Als Suspensionsmedium ist Wasser oder physiologische NaCl-Lösung  
bevorzugt.

20 In einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung liegt das erfindungsgemäße  
System für den Transport von Aktivstoffen als Emulsion vor, wobei sowohl Wasser-in-Öl- als  
auch Öl-in-Wasser-Emulsionen möglich sind. Die magnetischen Partikel liegen vorzugsweise  
ausschließlich in der Öl-Phase vor, welche die innere Phase, d.h. die Tröpfchen bildet.  
Zusätzlich können auch magnetische Partikel in der Wasser-Phase angereichert sein. In  
25 Fällen, in denen die magnetischen Partikel in der Öl-Phase vorliegen, spricht man auch von  
Ölferrofluiden. Es können sowohl Makroemulsionen als auch Mikroemulsionen eingesetzt  
werden, d.h. thermodynamisch stabile Emulsionssysteme mit Tröpfchengrößen < 500 nm.

30 Ölferrofluide können als Träger für lipidlösliche Aktivstoffe dienen, so dass sowohl die  
magnetisierbaren Partikel als auch der bzw. die Aktivstoffe in der Öl-Phase vorliegen. In einer  
weiteren Ausgestaltung werden wasserlösliche Aktivstoffe eingesetzt, die in gelöster Form in  
der wässrigen Phase vorliegen, und die magnetischen Partikel in der Öl-Phase vorliegen.

35 Um eine Erhöhung der physiologischen Verträglichkeit und eine schnelle Verteilung der  
Aktivstoffe im Blutstrom zu bewirken, kann eine Emulgierung der beladenen Partikel in  
Wasser gegebenenfalls auch unter Verwendung geeigneter physiologisch verträglicher  
Emulgatoren erfolgen. Ein Beispiel für einen handelsüblichen Emulgator ist Solutol® (BASF

AG). Liegen der Aktivstoff und die magnetischen Partikel in der Öl-Phase vor, so können auch hier die Wirkstoffe an die magnetischen Partikel gebunden sein (adsorbiert sein), was jedoch nicht unbedingt erforderlich ist.

- 5 In einer weiteren Ausgestaltung können wasserlösliche Wirkstoffe in der Wasser-Phase einer Ölferrofluid-Emulsion gelöst oder suspendiert werden. Diese Ausführungsform ist besonders geeignet, wenn die Aktivstoffe wasserlösliche Polymere, wie Zellbestandteile, Proteine etc. sind. Unter Zuhilfenahme geeigneter Emulgatoren kann eine derartige Aktivstoffe enthaltende Wasserphase in eine magnetisches Öl enthaltende Emulsion überführt werden. Das  
0 Emulsionsgemisch kann anschließend mittels Permanentmagnetfeld am Wirkort aufkonzentriert werden.

- In einer bevorzugten Ausführung werden die unabhängig voneinander in der wässrigen Phase vorliegenden Aktivstoffe und magnetischen Partikel in den wässrigen Innenraum von  
5 Liposomen eingeschlossen. Falls erwünscht kann die nicht-eingeschlossene Fraktion durch Zentrifugation oder Gelchromatographie abgetrennt werden, woraus ein gereinigtes magnetisches Liposomenprodukt resultiert. Derselbe Prozess kann angewandt werden, um oben beschriebene magnetischen Partikel mit adsorbierten Aktivstoffen liposomal zu verkapseln.

- 10 In einer möglichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Aktivstoffe auf den magnetischen Partikeln adsorbiert und liegen gleichzeitig in freier Form in der wässrigen Phase und/oder in der Öl-Phase vor. Die Adsorption erfolgt entweder während der Bildung der magnetischen Partikel durch Fällung oder durch Suspendieren der magnetischen Partikel  
15 in einer Lösung, einer Suspension bzw. einer Dispersion der Aktivstoffe. Die beladenen Partikel können jeweils in Form einer Suspension, Mikroemulsion, Öl-in-Wasser-Emulsion, Wasser-in-Öl-Emulsion, Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion etc. formuliert werden. Die beladenen magnetischen Partikel können in der wässrigen Phase oder in der Öl-Phase angereichert sein.

- 20 Die Herstellung des erfindungsgemäßen Systems für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System kann auf verschiedene Arten erfolgen.

- 25 In einer ersten Ausführungsform werden ein wasserlöslicher oder in Wasser suspendierbarer Aktivstoff und eine in Wasser lösliche Vorstufe der magnetischen Partikel in Wasser gelöst und die magnetischen Partikel durch Ausfällung gebildet, wobei die magnetischen Partikel beladen mit dem Aktivstoff als Feststoff ausfallen.

In einer weiteren Ausgestaltung dieses Herstellungsverfahrens werden die magnetischen Partikel in eine Lösung oder Suspension des Aktivstoffs in Wasser oder einer anderen Flüssigkeit gegeben. Das Beladen der magnetischen Partikel mit Aktivstoff erfolgt durch Adsorption auf der Oberfläche der magnetischen Partikel.

In einer weiteren Ausgestaltung können ölbasierte Ferrofluide erhalten werden. Vorzugsweise werden die magnetischen Partikel zunächst mit einem festen oder flüssigen Öl oder geschmolzenem Wachs unter Rühren und ggf. unter Erwärmen vermischt. Anschließend können die erhaltenen lipidlöslichen Partikel in Gegenwart des Aktivstoffes in an sich bekannter Weise in Wasser emulgiert werden.

Als Öle oder Wachse können alle auf dem jeweiligen Einsatzgebiet geeigneten und bei Verarbeitungstemperatur flüssigen natürlichen oder sythetischen Öl oder Wachse eingesetzt werden, sofern sie pharmazeutisch unbedenklich sind. Sofern die Öle oder Wachse in fester Form vorliegen, können sie zur Herstellung eines ölbasierten Ferrofluids erwärmt werden.

In einer weiteren Ausgestaltung des Herstellungsverfahrens können lipidlösliche Aktivstoffe in dem erfindungsgemäßen System eingesetzt werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung werden diese Aktivstoffe zunächst mit den erhaltenen lipidlöslichen Partikeln vermischt und das Gemisch wird anschließen in Wasser emulgiert. In einer weiteren möglichen Ausgestaltung können die lipidlöslichen Aktivstoffe zu den magnetischen Partikeln zugesetzt werden bevor oder während diese mit dem festen oder flüssigen Öl oder Wachs vermischt werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung werden diese Aktivstoffe zunächst mit den erhaltenen lipidlöslichen Partikeln vermischt und das Gemisch wird anschließen in Wasser emulgiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des oben beschriebenen Systems für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System für den zielgerichtete Transport pharmazeutischen Wirkstoffen in dem biologischen System sowie die Verwendung des Systems für die Anreicherung von Aktivstoffen in dem biologischen System an vorgegebenen Orten. Zu diesem Zweck kann das Ferrofluid-Arzneistoffprodukt in geeignete konventionelle Arzneiformen überführt oder eingearbeitet werden. Z.B. eignet sich für die orale Verabreichung eines mit Arzneistoff beladenen Ölferrofluids die Arzneiform der Soft-Gelatine Kapsel. Für die systemische Injektion oder die inhalative Anwendung eignet sich besonders die Form der liposomalen Verkapslung wie

oben beschrieben. Zur Einbringung und Positionierung in Körperhöhlen wie Peritoneum, Blasenraum, Urogenital- und Vaginaltrakt sind wässrige Suspensionen oder Öl-in-Wasser-Emulsionen besonders geeignet. Für den gezielten Transport der verwendeten Aktivstoffe kann beispielsweise extern ein Magnetfeld an oder in der Nähe des zu behandelnden „Ortes“,  
5 angelegt werden, wodurch der Aktivstoff an der gewünschten Stelle lokal konzentriert werden kann (Drug-targeting).

Die Aktivstoffe können am Zielorgan bzw. Zielort ihre Wirkung entsprechend ihrer Aktivität entfalten und ggf. von den Partikel freigesetzt werden.

Aktivstoffe, die ihre Wirkung unmittelbar durch Kontakt mit dem zu behandelnden biologischen System entfalten sollen, werden vorzugsweise unmittelbar am Wirkort freigesetzt. Ein Beispiel für derartige Aktivstoffe ist die Wirkung von Chemotherapeutika, Cytostatika, die Therapie unterstützenden Wirkstoffen, wie entzündungshemmenden Mitteln,  
5 Schmerzmittel, etc., die mittels angelegtem Magnetfeld durch Transport über die magnetischen Partikel zu ihrem Wirkort transportiert werden, dort aufgrund ihrer Affinität zum behandelnden Gewebe, Tumor o. ä. freigesetzt werden und ihre Wirkung entfalten. Nach Beendigung der Freisetzung können die magnetischen Partikel wieder über das angelegte Magnetfeld, das bedeutet nach Verändern der Position des Magnetfelds, aus dem Körper entfernt werden.

Werden beispielsweise die voranstehend beschriebenen Bisphosphonate als Aktivstoffe verwendet, so kann bei der Behandlung von Knochentumoren bzw. Metastasen im Knochen, das erfindungsgemäße System, ein Ferrofluid aus magnetischen Partikeln und Bisphosphonat,  
15 zum Tumor transportiert werden. Das Bisphosphonat wird an das Knochenapatit gebunden und inhibiert den Knochenumbau. Durch das externe Magnetfeld werden die Tumorzellen lokal erhitzt und so zerstört.

In einer weiteren Ausführungsform können Aktivstoffe, die radiologische Eigenschaften zeigen, wie  $\gamma$ -Strahler etc., erfindungsgemäß zu ihrem Wirkort transportiert werden, dort das zu behandelnde Gewebe, gegebenenfalls mit externer Erwärmung, durch lokale Bestrahlung zerstören. Zum Abschluss der Bestrahlung können die Partikel mittels eines Magnetfelds wieder entfernt werden.

Neben dem Targeting-Effekt hat der Einsatz der magnetischen Partikel hat den weiteren Vorteil, daß die Partikel durch die andauernde Magnetisierung die Freisetzung der Aktivstoffe gefördert wird. Durch die andauernde Magnetisierung kann eine lokale Überwärmung

entstehen, wodurch die Freisetzung von Aktivstoffen, die nur lose auf der Oberfläche der Partikel aufgebracht sind, unterstützt wird. Ein weiterer Freisetzungsmechanismus, der insbesondere dann auftritt, wenn keine Dauermagnetisierung vorliegt, ist die langsame Dissoziation des Aktivstoffes vom magnetischen Partikel. Diese Freisetzung kann über eine chemische, insbesondere enzymatische, hydrolytische oder thermische Abspaltung oder auch über eine rein physikalische Abspaltung erfolgen. Die thermische Abspaltung der Aktivstoffe von den magnetischen Partikeln wird vorzugsweise durch ein angelegtes Magnetfeld unterstützt.

Ein weiterer Vorteil der bei der andauernden Magnetisierung der am lokalen Wirkort befindlichen magnetischen Partikel ist die auftretende lokale Überwärmung. Diese kann genutzt werden, um erkrankte Gewebe beziehungsweise Tumorgewebe zu zerstören. Die lokale Überwärmung mittels Einsatz von magnetischem Feld wird auch als lokale oder zelluläre Hyperthermie bezeichnet.

Die Kombination aus dem erfindungsgemäßen System und der Hyperthermie lässt sich beispielsweise auch bei der Behandlung von Tumoren, die unter Verwendung von sogenannten Thermo-seeds behandelt werden können, einsetzen. Die Thermo-seeds bestehen in der Regel aus einer Legierung aus einem magnetischem Metall, wie Eisen oder Kobalt, und einem nichtmagnetischen Material, wie den Edelmetallen Gold, Silber, Palladium oder Platin. Nach Implantation der Thermo-seeds in den Tumor kann das erfindungsgemäße System, das beispielsweise magnetische Partikel und ein Chemotherapeutikum als Aktivstoff enthalten, verabreichen. Das erfindungsgemäße System reichert sich in Thermo-seeds an und bildet so ein lokales Cytostatikumdepot. Im Anschluss an die Anreicherung des erfindungsgemäßen Systems am Tumor kann die übliche Thermo-seed-Behandlung erfolgen, indem außerhalb des Körpers ein magnetisches Wechselfeld abgestrahlt wird, welches zu einer Erhitzung der Thermo-seeds und die damit verbundene Zerstörung der Tumorzellen führt.

Eine ähnliche tumorbehandelnde Wirkung kann erreicht werden, wenn als Aktivstoff ein Metall mit einer guten Wärmeleitfähigkeit, wie Palladium oder Platin verwendet wird. In dieser Ausführungsform wird das erfindungsgemäße System aus magnetischen Partikel und Metall an ihren Wirkort transportiert, anschließend erfolgt eine Erwärmung auf den Curie-Punkt durch externes Anlegen eines magnetischen Wechselfeldes. Die auftretende limitierte Überwärmung führt zur Zerstörung der Tumorzellen. Diese Ausführungsform kann auf jeden beliebigen Tumor angewendet werden. Das erfindungsgemäße System kann in einer geeigneten pharmazeutischen Zubereitung wie oben beschrieben injiziert oder auch inhaliert

werden. Beispielsweise ist die Inhalation dieses Systems zur Behandlung von Lungentumoren geeignet.

### Beispiele

#### Beispiel 1: Herstellung eines wasserdispergierten Ferrofluids

5 6.48g  $\text{FeCl}_3$  wurden in 40 g entionisiertem Wasser gelöst. Außerdem wurden 3,97 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  in einer Mischung aus 8 ml entionisiertem Wasser und 2 ml 37%iger Salzsäure gelöst. Kurz vor Einsatz der Lösungen im Fällungsprozess wurden die beiden Mischungen vereinigt.

10 In einem Becherglas wurden 400 ml entionisiertes Wasser mit 10 g NaOH und 0,2 g Hydroxyethandiphosphonsäure (HEDP) verrührt. Nach Abkühlen wurden hierzu unter starkem Rühren die salzsaure Eisensalzlösung gegossen. Mittels Magnetfeld wurde der gebildete schwarze Niederschlag sedimentiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Anschließend wurde das gefällte Material mehrmals in Wasser aufgenommen und dekantiert,  
15 um Fremdionen zu entfernen. Anschließend wurden 0,5 g HEDP und 100 ml Wasser zugegeben. Nach 1stündigem Rühren bei 40 °C wurde 12 h lang bei RT nachgerührt. Nicht suspendierte Anteile wurden durch Zentrifugieren (5000-11000 Umdrehungen/Minute) abgetrennt. Auf diese Weise wurde eine magnetische Flüssigkeit erhalten, die im Rotationsverdampfer bis zum Erhalt des gewünschten Feststoffgehalts eingeeengt wurde.

20

#### Beispiel 2: Herstellung einer Ölferrrofluid-in-Wasser-Emulsion

##### a. Herstellung des Ölferrrofluids

7.8 g wasserfreies Eisen(III)-chlorid wurden in 50g  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser gelöst. Gleichzeitig  
25 wurden in einem zweiten Gefäß 4.8g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  in 10g Wasser gelöst und mit Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert. Beide Lösungen wurden dann vereinigt und zu einer kräftig gerührten Vorlage, bestehend aus 100 ml 25%iger Ammoniaklösung und 300 ml entionisiertem Wasser unter Ausfällung eines schwarzen Niederschlags gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und jeweiligem Abzentrifugieren und Abdekantieren  
30 überstehender wässriger Phase wurde der Niederschlag mit 100g Wasser und 2.0g Laurinsäure versetzt. Unter Rühren wurde auf 85 °C erwärmt, bis der Niederschlag unter Flockenbildung sedimentierte. Anschließend wurde zu der noch 85°C heißen Mischung 10g Sonnenblumenöl gegeben und eine Stunde gerührt. Hierbei ging der Niederschlag dispersionsstabil in die Ölphase über, welche abgetrennt und mehrmals mit Wasser  
35 ausgeschüttelt wurde. Es wurde ein ölbasiertes Ferrofluid erhalten.



## b. Transport eines Aktivstoffs zu einem befallenen Gelenk

(Aktivstoff: Antirheumatikum Nabumeton)

Das erhaltene Ölferrrofluid wurde mit isotonischer Salzlösung im Volumenverhältnis 1: 9 vermischt. Durch Zugabe des Emulgators Solutol® HS 15 (Polyethylenglykol 660-12-Hydroxystearat, Hersteller: BASF AG) mit einem Gewichtsanteil von 15g pro Liter und anschließendem Rühren mittels Magnetprüher wurde eine Ferrrofluid-in-Wasser-Emulsion erhalten mit Tröpfchengrößen im Bereich 10 - 100 µm. Die Beladung mit dem öllöslichen Wirkstoff (Nabumeton) erfolgte vor der Emulgierung durch Lösen von 2 ml Wirkstoff in 8 ml ölbasiertem Ferrrofluid.

Beispiel 3: Herstellung eines Ferrrofluids, worin der Aktivstoff der Ölfphase entspricht

7.8 g wasserfreies Eisen(III)-chlorid wurden in 50 g CO<sub>2</sub>-freiem Wasser gelöst. In einem zweiten Gefäß wurden 4.8 g FeCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O in 10 g Wasser gelöst, die erhaltene Lösung wurde mit Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert. Beide Lösungen wurden zu einer Mischung vereinigt und zu einer stark gerührten Vorlage, bestehend aus 100 ml 25% Ammoniaklösung und 300 ml entionisiertem Wasser unter Ausfällung eines schwarzen Niederschlags gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und jeweiliger Abzentrifugation und Abdekantieren überstehender wässriger Phase wurde der Niederschlag mit 100 g Wasser und 2.0 g Laurinsäure versetzt. Unter Rühren erwärmte man auf 85 °C, bis der Niederschlag unter Flockenbildung sedimentierte. Anschließend wurden zu der noch 85°C heißen Mischung 10 g des öllöslichen Wirkstoffes Nabumeton gegeben und eine Stunde gerührt. Hierbei ging der Niederschlag dispersionsstabil in die Ölfphase über, welche abgetrennt und mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt wurde. Man erhielt ein ölbasiertes Ferrrofluid.

Das Ölferrrofluid wurde mit isotonischer Salzlösung im Volumenverhältnis 1 : 9 vermischt. Durch Zugabe des Emulgators Solutol HS 15 (Polyethylenglykol 660-12-Hydroxystearat, Hersteller: BASF AG) mit einem Gewichtsanteil von 15g pro Liter und anschließendes Rühren mittels Magnetprüher wurde eine Ferrrofluid-in-Wasser-Emulsion erhalten mit Tröpfchengrößen im Bereich 5-100 Mikrometer. Zur Wirkstoffdosierung wurde die Ölfphase entsprechend mit isotonischer Salzlösung verdünnt.

Beispiel 4: Liposomal verkapseltes wasserdispertiertes Ferrrofluid

5 g Phospholipon werden in einem Rundkolben in Chloroform gelöst und die organische Phase unter Vakuum am Rotationsverdampfer abgezogen, bis sich ein dünner

lösungsmittelfreier Lipidfilm gebildet hat. 100 ml des wasserdispergierten Ferrofluidprodukts von Beispiel 1 wird unter leichtem Erwärmen zu dem Lipidfilm gegeben und für eine Stunde an einem mechanischen Schüttler bewegt, bis sich der Lipidfilm komplett von der Wand abgelöst hat und sich Liposomen gebildet haben. Das Präparat wird für 1-2 Minuten mit  
5 Ultraschall behandelt, um eine Grössenverteilung der Liposomen im Nanometerbereich zu erreichen. Das Präparat wird dann über eine Sephadex-G75 Säule von der nichtverkapselten Fraktion getrennt. Die Ferrofluid-Liposomendispersion kann mit isotonischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

10 Beispiel 5: Wässrige Lösungen natürlicher oder synthetischer Proteine

1 ml einer wässrigen Lösung von Urodilatin (nephroprotektives Protein) wurde in 9 ml des ölasierten Ferrofluids aus Beispiel 2 durch Zusatz von 1g Solutol® HS 15 und Rühren mittels  
15 Magnetprürer bei Raumtemperatur emulgiert. Man erhielt eine Wasser-in-Ferrofluid-Emulsion, welche in 30 ml einer 1%igen wässrigen Solutollösung mittels Magnetprürung emulgiert wurde. Es bildete sich eine proteinhaltige Wasser-in- Ferrofluid-in-Wasser-Emulsion mit Tröpfchengrößen im Bereich zwischen 3-50 Mikrometer.

20 Das Ferrofluid wird injiziert und transportiert das magnetunterstützte Urodilatin gezielt zum Wirkort Niere. Danach erfolgt Desorption und Separation der unbeladenen Partikel aus dem Blut über externe Blutwäsche, d.h. Ferropartikel werden durch magnetische Blutadsorber eingefangen und entsorgt.

25 Beispiel 6: Magnetischer Transport von DNA in einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion

1 ml einer isotonischen Salzlösung des Oligonucleotids single strand 24mer phosphorothioat (synthetisches DNA-Derivat) wurde in 9 ml des ölasierten Ferrofluids aus Beispiel 2 durch  
30 Zusatz von 1g Solutol® HS 15 und starkes Rühren mittels Magnetprürer bei Raumtemperatur emulgiert. Man erhielt eine nicht langzeitstabile Wasser in Ferrofluid-Emulsion, welche in 30 ml einer 1%igen wässrigen Solutollösung mittels Magnetprürung emulgiert wurde. Es bildete sich eine oligonucleotidhaltige Wasser in Ferrofluid-in-Wasser-Emulsion mit Tröpfchengrößen im Mikrometerbereich.

35 Beispiel 7: Magnetischer Transport von Zellen und Zellbestandteilen in einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion

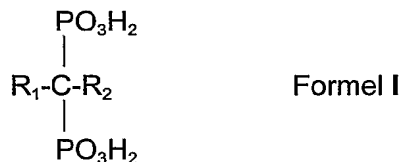
1 ml einer isotonischen Salzlösung von gentechnisch veränderten Epithelzellen wurden in 9 ml in Beispiel 2 erhaltenen Ferrofluids durch Zusatz von 1g Solutol® HS 15 und Rühren mittels Magnetprüher bei Raumtemperatur emulgiert. Man erhielt eine nicht lang-zeitstabile Wasser in Ferrofluid-Emulsion, welche in 30 ml einer 1%igen wasserigen Solutollösung  
5 mittels Magnetprüher emulgiert wurde. Es bildete sich eine zellhaltige Wasser-in-Ferrofluid-in-Wasser-Emulsion mit Tröpfchengrößen im Mikrometerbereich.

Die erhaltene zellhaltige Ferrofluid-Emulsion ist beispielsweise zum zielgerichteten Transport und zur Plazierung der Zellen an einem speziellen Wirkort geeignet, wie z. B. zur Anheftung  
10 der Zellen an bestimmte Gefäßwandstellen (z. B. in Coronararterien nach PTCA).

**Patentansprüche**

- 5 1. Stabilisator-freies System für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System aus einem oder mehreren Aktivstoff(en) sowie magnetischen Partikeln, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Partikel auf zumindest einem Teil ihrer Oberfläche mit Aktivstoff(en) versehen sind.
- 10 2. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** das biologische System der menschliche oder tierische Körper, ein extrakorporales System, wie aus dem Körper eluierte Zellen/Zellkulturen und/oder außerhalb des Körpers befindliche Geräte, in denen Körperflüssigkeiten gereinigt, werden, ist.
3. System nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen Partikel ausgewählt sind aus superparamagnetischen Metalloxiden und/oder Metallen.
- 5 4. System nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen Oxide ausgewählt sind aus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  und beliebigen Gemischen daraus.
- 10 5. System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** magnetischen Partikel eine Teilchengröße von 1 bis 300 nm, vorzugsweise bis 100 nm, aufweisen.
- 10 6. System nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Aktivstoffe ausgewählt sind aus Stoffen, die in den Körper eingebracht werden, als auch aus Stoffen, die aus ihm entfernt werden sollen.
- 15 7. System nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Aktivstoffe ausgewählt sind aus synthetischen pharmazeutischen Wirkstoffen, natürlichen pharmazeutischen Wirkstoffen und Extrakten, natürlichen und rekombinanten Peptiden, Proteinen, Enzymen, Antikörpern und Antikörperfragmenten, endogenen biologischen Einheiten, wie lebenden und abgestorbene Zellen, Zellbestandteilen und Organellen, synthetischer und natürlicher DNA, Genen, Chromosomen, gentechnisch veränderten autologen oder heterologen Zellen, und xenobiotischen Einheiten, wie 20 Bakterien, Viren, Mycoplasma, Pilze, und Sporen, wärmeleitfähigen Substanzen, wie Metalle, radiologisch wirksamen Stoffen, wie  $\gamma$ -Strahler, Aktivstoffe enthaltenden partikulären exogenen Einheiten, wie Liposomen, Mikrokapseln und Nanopartikeln, sowie beliebige Gemische der voranstehenden.

8. System nach einem der Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Aktivstoffe ausgewählt sind aus wasserlöslichen und/oder lipidlöslichen pharmazeutischen Wirkstoffen.
9. System nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die wasserlöslichen Aktivstoffe ausgewählt sind aus geminalen Bisphosphonsäuren und/oder deren physiologisch verträglichen Salzen der allgemeinen Formel I



in der ist

$\text{R}_1$  ein linearer oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, der gegebenenfalls substituiert sein kann durch Substituenten wie Aminogruppen, N-Mono- bzw. N-Dialkylaminogruppen, wobei die Alkylgruppen 1 bis 5 C-Atome und/oder SH-Gruppen enthalten können, oder ein substituierter oder unsubstituierter carbo- oder heterocyclischer Arylrest, der ggf. ein oder mehrere Heteroatome und als Substituenten verzweigte und unverzweigte Alkylreste mit 1 bis 6 C-Atomen, freie oder mono- resp. dialkylierte Aminogruppen mit 1 bis 6 C-Atomen oder Halogenatome aufweisen kann, ist und

$\text{R}_2$  gleich OH, ein Halogenatom, vorzugsweise Cl, H oder  $\text{NH}_2$ .

10. System nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Bisphosponat ausgewählt ist aus 3-(Methyl-pentylamino)-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Ibandronsäure), 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Etidronsäure), Dichlormethandiphosphonsäure (Clodronsäure), 3-Amino-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Pamidronsäure), 4-Amino-1-hydroxybutan-1,1-diphosphonsäure (Alendronsäure), 2-(3-Pyridin)-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Risedronsäure), 4-Chlorphenylthiomethan-1,1-diphosphonsäure (Tiludronsäure), Pyrimidinyl-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Zoledronsäure), Cycloheptylaminomethan-1,1-diphosphonsäure (Cimadronsäure), 6-Amino-1-hydroxyhexan-1,1-diphosphonsäure (Neridronsäure), 3-(N,N-Dimethylamino)-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure (Olpadronsäure), 3-Pyrrol-1-hydroxypropan-1,1-diphosphonsäure und/oder 2-Pyrimidazol-1-hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure (Minodronsäure) sowie deren physiologisch verträglichen Salzen.

11. System nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** es in eine pharmazeutische Zubereitung für die orale, parenterale, intravenöse, inhalative und/oder topische Applikation überführt wird.
- 5 12. System nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** es als Suspension, Emulsion oder liposomales System vorliegt.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung eines Systems für den Transport von Aktivstoffen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein wasserlöslicher oder in Wasser suspendierbarer Aktivstoff und eine in Wasser lösliche Vorstufe der magnetischen Partikel in Wasser gelöst und die magnetischen Partikel durch Ausfällung gebildet, wobei die magnetischen Partikel beladen mit dem Aktivstoff als Feststoff ausfallen.
- 15 14. Verfahren zur Herstellung eines Systems für den Transport von Aktivstoffen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen Partikel in eine Lösung oder Suspension des Aktivstoffs in Wasser oder einer anderen Flüssigkeit gegeben werden.
- 20 15. Verfahren zur Herstellung eines Systems für den Transport von Aktivstoffen nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen Partikel mit einem festen oder flüssigen Lipid unter Rühren vermischt und die erhaltenen lipidlöslichen Partikel in Gegenwart des Aktivstoffes in Wasser emulgiert werden.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein lipidlöslicher Aktivstoff mit den erhaltenen lipidlöslichen Partikeln vermischt und das Gemisch in Wasser emulgiert wird.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen Partikel und das feste oder flüssige Lipid in Gegenwart eines lipidlöslichen Aktivstoffs vermischt werden.
- 35 18. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die magnetischen lipidlöslichen Partikel emulgiert werden und die erhaltenen Emulsion anschließend mit einer wässrigen Lösung des Aktivstoffs vermischt wird.
- 40 19. Verwendung des Systems für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System nach einem der Ansprüche 1 bis 12 für den zielgerichtete Transport pharmazeutischen Wirkstoffen in dem biologischen System.

20. Verwendung des Systems für den Transport von Aktivstoffen in einem biologischen System nach einem der Ansprüche 1 bis 12 für die Anreicherung von Aktivstoffen in dem biologischen System an vorgegebenen Orten.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03318

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K9/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                              | Relevant to claim No. |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | DE 44 27 821 A (SILICA GEL )<br>1 February 1996 (1996-02-01)<br>claims 1-3,10<br>column 1, line 66 -column 2, line 11<br>---    | 1,3-8,<br>11-20       |
| X          | DE 196 12 001 A (SILICA GEL)<br>25 September 1997 (1997-09-25)<br>claims 1-5,7<br>column 4, line 54 -column 5, line 21<br>----- | 1,3-8,<br>11-20       |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2001

Date of mailing of the international search report

01/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ventura Amat, A



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/03318

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 4427821 A                              | 01-02-1996          | DE 4309333 A               | 22-09-1994          |
|                                           |                     | AT 191086 T                | 15-04-2000          |
|                                           |                     | WO 9603653 A               | 08-02-1996          |
|                                           |                     | DE 59508069 D              | 27-04-2000          |
|                                           |                     | EP 0772776 A               | 14-05-1997          |
|                                           |                     | JP 10503281 T              | 24-03-1998          |
|                                           |                     | US 5928958 A               | 27-07-1999          |
|                                           |                     | AT 156706 T                | 15-08-1997          |
|                                           |                     | DE 4407338 A               | 07-09-1995          |
|                                           |                     | WO 9421240 A               | 29-09-1994          |
|                                           |                     | DE 59403734 D              | 18-09-1997          |
|                                           |                     | EP 0689430 A               | 03-01-1996          |
|                                           |                     | JP 8508721 T               | 17-09-1996          |
|                                           |                     | US 5916539 A               | 29-06-1999          |
| DE 19612001 A                             | 25-09-1997          | WO 9735200 A               | 25-09-1997          |
|                                           |                     | EP 0888545 A               | 07-01-1999          |
|                                           |                     | JP 2000507197 T            | 13-06-2000          |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03318

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                    | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | DE 44 27 821 A (SILICA GEL )<br>1. Februar 1996 (1996-02-01)<br>Ansprüche 1-3,10<br>Spalte 1, Zeile 66 -Spalte 2, Zeile 11<br>---     | 1,3-8,<br>11-20    |
| X          | DE 196 12 001 A (SILICA GEL)<br>25. September 1997 (1997-09-25)<br>Ansprüche 1-5,7<br>Spalte 4, Zeile 54 -Spalte 5, Zeile 21<br>----- | 1,3-8,<br>11-20    |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juli 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ventura Amat, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03318

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 4427821 A                                       | 01-02-1996                    | DE 4309333 A                      | 22-09-1994                    |
|                                                    |                               | AT 191086 T                       | 15-04-2000                    |
|                                                    |                               | WO 9603653 A                      | 08-02-1996                    |
|                                                    |                               | DE 59508069 D                     | 27-04-2000                    |
|                                                    |                               | EP 0772776 A                      | 14-05-1997                    |
|                                                    |                               | JP 10503281 T                     | 24-03-1998                    |
|                                                    |                               | US 5928958 A                      | 27-07-1999                    |
|                                                    |                               | AT 156706 T                       | 15-08-1997                    |
|                                                    |                               | DE 4407338 A                      | 07-09-1995                    |
|                                                    |                               | WO 9421240 A                      | 29-09-1994                    |
|                                                    |                               | DE 59403734 D                     | 18-09-1997                    |
|                                                    |                               | EP 0689430 A                      | 03-01-1996                    |
|                                                    |                               | JP 8508721 T                      | 17-09-1996                    |
|                                                    |                               | US 5916539 A                      | 29-06-1999                    |
| DE 19612001 A                                      | 25-09-1997                    | WO 9735200 A                      | 25-09-1997                    |
|                                                    |                               | EP 0888545 A                      | 07-01-1999                    |
|                                                    |                               | JP 2000507197 T                   | 13-06-2000                    |